



Title	Modeling virus-associated acute encephalopathy pathophysiology using an in vitro blood-brain barrier model and dynamic evaluation of endothelial cell injury(内容・審査結果要旨)
Author(s)	前田, 創
Citation	
Issue Date	2019-03-22
URL	http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/980
Rights	
DOI	
Text Version	none

This document is downloaded at: 2023-05-05T09:27:42Z

論文内容要旨

しめい 氏名	前田 創
学位論文題名	Modeling virus-associated acute encephalopathy pathophysiology using an <i>in vitro</i> blood-brain barrier model and dynamic evaluation of endothelial cell injury (血液脳関門モデルを用いた <i>in vitro</i> ウイルス関連急性脳症病態の作製と血管内皮細胞障害の動的評価)
<p>【背景】 ウイルス関連急性脳症 (VAE) は、ウイルス感染に伴う急性脳障害である。VAE の病態は、高サイトカイン血症により血液脳関門 (BBB) が障害される非炎症性の脳浮腫である。我々は以前に単離した臍帯静脈内皮細胞において $\text{TNF-}\alpha$ が濃度依存的に血管透過性を亢進させることを経内皮細胞電気抵抗 (TER) 測定により電気生理学的に示し、またデキストランを用いて実際に透過性が亢進していることを機能的に示した。しかし、臓器により血管内皮細胞のタイト結合を構成する蛋白の発現が異なるため、VAE の病態を再現するには、脳血管内皮細胞による検討が必要となる。今回、我々はヒト脳血管内皮細胞と周皮細胞を用いた <i>in vitro</i> BBB モデルにより <i>in vitro</i> VAE モデルを作製し、炎症性サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$ による脳血管内皮細胞障害の動的変化を評価した。</p> <p>【方法】 ①ヒト脳血管内皮細胞と周皮細胞をトランスウェル膜の上部と下部にそれぞれ培養し、cellZscope®を用いて TER を経時的に測定した。TER がプラトーになったことを確認後、段階希釈した $\text{TNF-}\alpha$ を添加して <i>in vitro</i> VAE モデルを作製し、TER を継続して測定した。②同様のトランスウェルシステムを用いて分子量の異なるフルオレセインナトリウム (分子量 376 Da) または FITC 標識デキストラン (分子量 3-5 kDa、70 kDa、250 kDa) を添加し物質の細胞透過を蛍光マイクロプレートリーダーにより評価した。③$\text{TNF-}\alpha$ 添加後の血管透過性変化に伴う claudin-5 と ZO-1 の局在変化を蛍光免疫染色により、また claudin-5 の蛋白発現変化をウェスタンブロット法によって観察した。</p> <p>【結果】 ①TER 値は、$\text{TNF-}\alpha$ 添加後に減少し、最小値に達した後、徐々に回復したが、回復までの時間は、$\text{TNF-}\alpha$ 濃度に依存し遅延した。②溶質透過試験では、$\text{TNF-}\alpha$ 添加後にすべての分子量の物質の透過性が亢進したが、その程度は分子量と $\text{TNF-}\alpha$ 濃度に依存し、経時的に回復の傾向を認めた。③claudin-5 の局在は、$\text{TNF-}\alpha$ 添加後に変化し、局在の回復時間は $\text{TNF-}\alpha$ 濃度に依存し遅延した。一方、ZO-1 の局在には変化がみられなかった。claudin-5 の発現は、$\text{TNF-}\alpha$ 添加 24 時間後に減少し、48 時間後に完全に回復した。</p> <p>【結論】 脳血管内皮細胞と周皮細胞を用いた血液脳関門モデルを用い、$\text{TNF-}\alpha$ を添加することにより <i>in vitro</i> の VAE モデルを作製した。TER 測定と溶質透過試験は $\text{TNF-}\alpha$ による血管内皮細胞障害による透過性亢進を評価するのに有用である。この評価方法は、VAE の病態解明だけではなく、血管透過性に焦点をあてた特異的治療法開発に有用であろう。</p>	

学位論文審査結果

平成 31 年 1 月 28 日

大学院医学研究科長様

下記のとおり学位論文の審査を終了したので報告いたします。

【審査結果要旨】

氏 名 前田 創

学位論文題名 Modeling virus-associated acute encephalopathy pathophysiology using an in vitro blood-brain barrier model and dynamic evaluation of endothelial cell injury.
(血液脳関門モデルを用いた in vitro ウイルス関連急性脳症病態の作製と血管内皮細胞障害の動的評価)

ウイルス関連急性脳症 (VAE) はウイルス感染に伴う急性脳障害で、その病態は高サイトカイン血症により血液脳関門 (BBB) が障害される非炎症性の脳浮腫である。申請者の所属する研究室では、単離した臍帯静脈内皮細胞を使ったモデルで、TNF- α が濃度依存的に血管透過性を亢進させることを経内皮細胞電気抵抗 (TER) 測定により電気生理学的に示し、またデキストランを用いて実際に透過性が亢進していることを機能的に示した。しかし、臓器により血管内皮細胞のタイト結合を構成する蛋白の種類が異なるため、VAE の病態を再現するには脳血管内皮細胞による検討が必要と考えた。そこで、ヒト脳血管内皮細胞と周皮細胞を用いた in vitro BBB モデルを作成し、TNF- α による脳血管内皮細胞障害の動的変化を評価した。その結果、細胞接着因子 claudin-5 の局在が TNF- α 添加後に変化し、透過性が亢進することや、この現象を引き起こすためには既に報告した臍帯静脈内皮細胞の系よりも高い濃度の TNF- α が必要であることが明らかとなった。以上の結果は BBB のモデルとして臍帯静脈の血管内皮細胞ではなく、脳血管内皮細胞を用いたモデルの方が適していること示すものであった。

本研究はウイルス感染が引き起こす VAE の病態を明らかにし、その予防法や治療法を研究するための新たな系を提案するものである。予備審査では質問に対し適切に回答していたことから、申請者が本研究の意義を深く理解し、将来に繋がる展望を明確に持っていることが窺えた。本論文は博士論文にふさわしい優れた論文で、今後の研究の発展を期待さ

せるものである。

学位論文審査委員

主査 錫谷達夫

副査 小島隆生

副査 苅谷慶喜